

Psi i mačke kao sentinel životinje za bolest Zapadnog Nila u urbanim sredinama

Vuger, Veronika

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Veterinary Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Veterinarski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:178:748076>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Veterinary Medicine -
Repository of PHD, master's thesis](#)



Sveučilište u Zagrebu
Veterinarski fakultet

Veronika Vuger

Psi i mačke kao sentinel životinje za bolest Zapadnog Nila u urbanim sredinama

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

Ovaj rad izrađen je u Virološkom laboratoriju Zavoda za mikrobiologiju i zarazne bolesti s klinikom Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Predstojnik: Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina

Mentor: prof. dr. sc. Ljubo Barbić

Članovi Povjerenstva za obranu diplomskog rada:

1. Izv. prof. dr. sc. Josipa Habuš
2. Izv. prof. dr. sc. Vilim Starešina
3. Prof. dr. sc. Ljubo Barbić
4. Prof. dr. sc. Zoran Milas (zamjena)

ZAHVALA

Zahvaljujem svom mentoru prof. dr. sc. Ljubi Barbiću na svojoj pomoći i savjetima prilikom izrade ovog diplomskog rada.

Zahvaljujem djelatnicima Virološkog laboratorija Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu na stručnoj podršci tijekom provođenja ovog istraživanja.

Zahvaljujem svim svojim prijateljima, koji su mi uljepšali studentske dane i uz koje je studiranje bilo znatno lakše i zabavnije.

Zahvaljujem svojoj obitelji, osobito svojim roditeljima, na svojoj danoj podršci, ljubavi te svemu što su mi kroz život pružili.

Veliko hvala mom Luki, na beskrajnom strpljenju, podršci i vjeri u moj uspjeh.

POPIS SLIKA

| | |
|---|----|
| Slika 1. Sadržaj komercijalnog kompleta za izvođenje imunoenzimnog testa (ELISA) INgezim West Nile Compac | 9 |
| Slika 2. Ispiranje jažica mikrotitracijske plitice u automatskom ispiraću | 10 |
| Slika 3. Mikrotitracijska plitica nakon dodavanja supstrata i inkubacije | 11 |
| Slika 4. Mikrotitracijska plitica tijekom dodavanja stop otopine | 11 |
| Slika 5. Mikrotitracijska plitica nakon dodavanja stop otopine..... | 12 |

POPIS TABLICA

| | |
|--|----|
| Tablica 1. Seroprevalencija po životinjskim vrstama..... | 14 |
| Tablica 2. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na mjesec uzimanja uzoraka | 14 |
| Tablica 3. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na dob | 15 |
| Tablica 4. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na spol..... | 15 |
| Tablica 5. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na županiju u kojoj borave | 16 |
| Tablica 6. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na kliničke znakove | 17 |
| Tablica 7. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na pasminu..... | 17 |
| Tablica 8. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na mjesec uzimanja uzoraka..... | 18 |
| Tablica 9. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na dob | 19 |
| Tablica 10. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na spol | 19 |
| Tablica 11. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na županiju u kojoj borave | 20 |
| Tablica 12. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na kliničke znakove | 20 |
| Tablica 13. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na pasminu..... | 20 |
| Tablica 14. Podaci o serološki pozitivnim psima na virus Zapadnog Nila | 22 |
| Tablica 15. Podaci o psima sa serološki sumnjivim rezultatima pretraživanja na virus Zapadnog Nila | 23 |
| Tablica 16. Podaci o serološki pozitivnim mačkama na virus Zapadnog Nila | 24 |
| Tablica 17. Podaci o mačkama sa serološki sumnjivim rezultatima pretraživanja na virus Zapadnog Nila | 24 |

POPIS GRAFIKONA

- Grafikon 1.** Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u pasa prema mjesecima uzorkovanja 15
- Grafikon 2.** Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u pasa prema dobi i spolu pretraživanih životinja 16
- Grafikon 3.** Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u pasa prema županiji boravka, kliničkim znakovima zbog kojih su primljeni na Sveučilišnu veterinarsku bolnicu i pasmini pretraživanih životinja 17
- Grafikon 4.** Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u mačaka prema mjesecima uzorkovanja 18
- Grafikon 5.** Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u mačaka prema dobi i spolu pretraživanih životinja..... 19
- Grafikon 6.** Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u mačaka prema županiji boravka, kliničkim znakovima zbog kojih su primljeni na Sveučilišnu veterinarsku bolnicu i pasmini pretraživanih životinja 21

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA | 2 |
| 2.1. Povijesni podaci i pregled dosadašnjih istraživanja | 2 |
| 2.2. Etiologija i epizootiologija | 3 |
| 2.3. Patogeneza | 4 |
| 2.4. Klinička slika | 4 |
| 2.5. Dijagnoza | 5 |
| 2.6. Liječenje i preventiva | 6 |
| 3. MATERIJALI I METODE | 7 |
| 3.1. Pretraživani uzorci | 7 |
| 3.2. Serološka dijagnostika | 7 |
| 3.3 Priprema seruma i otopine za razrjeđivanje | 9 |
| 3.4. Izvođenje pretrage | 9 |
| 3.5. Validacija testa | 12 |
| 3.6. Izračunavanje i interpretacija rezultata | 12 |
| 3.7. Statistička obrada rezultata | 13 |
| 4. REZULTATI | 14 |
| 5. RASPRAVA | 25 |
| 6. ZAKLJUČCI | 28 |
| 7. LITERATURA | 29 |
| 8. SAŽETAK | 32 |
| 9. SUMMARY | 33 |
| 10. ŽIVOTOPIS | 34 |

1. UVOD

Bolest Zapadnog Nila emergentna je transmisivna zoonoza. Uzročnik je virus iz porodice *Flaviviridae*, roda *Flavivirus*, koji prirodno cirkulira između rezervoara ptica i vektora komaraca, no slučajni domaćini mogu biti i mnogi sisavci, uključujući i ljude. Bolest se naziva još i groznica, vrućica ili encefalitis Zapadnog Nila, te u ljudi i nekih vrsta životinja može prouzrokovati neurološke kliničke znakove i smrt. Osim ptica, sve druge vrste prilikom infekcije ne predstavljaju izvor zaraze obzirom na malu količinu virusa u krvi tijekom viremije. Kako je ovo obligatno transmisivna bolest koju prenose komarci tijekom hranjenja u provođenje nadzora i suzbijanja ove bolesti usmjereno je na kontrolu vektora u svrhu sprječavanja zaražavanja ljudi (MADIĆ, 2012., BARBIĆ i sur., 2013., DENMAN i HART, 2015). Zbog poteškoća u nadzoru proširenosti uzročnika i njegove aktivnosti samo kroz praćenje vektora, u svrhu ranog otkrića virusne aktivnosti na nekom području pretražuju se različite vrste životinja, koje nazivamo sentinel životinje, kako bi dokazom njihovih infekcija dokazali rizik za infekcije ljudi i mogli provoditi protuepidemijske dezinfekcije. Sentinel životinje predstavljaju one životinjske vrste koje su podložne infekciji i razvijaju detektibilna protutijela, ali u idealnim slučajevima uopće ne razvijaju kliničku sliku, ili ju razvijaju u blagom obliku, koji ne izaziva uginuće (RESNICK i sur., 2007.). U potrazi za idealnom sentinel vrstom za nadzor bolesti Zapadnog Nila, učestalo su se koristili konji i perad koji su se pokazali izvrsnim indikatorom virusne aktivnosti na određenom području. Međutim, kako ove vrste praktično ne borave u urbanim sredinama razvila se ideja provođenja seroloških pretraživanja seruma pasa i mačaka, koji ne razvijaju klinički oblik bolesti, a koji bi zbog bliskog kontakta s ljudima i suživota u urbanim sredinama najvjernije prikazali izloženost ljudi potencijalnoj infekciji. Mnoga su istraživanja do danas dokazala prisutstvo IgG ili IgM protutijela u serumu tih vrsta (LAN i sur., 2011., PURPARI i sur., 2012., DURAND i sur., 2016., MAQUART i sur., 2017., DINÇ i YILDIRIM, 2020.) međutim mogućnost korištenja pasa i mačaka kao sentinel životinja u epizootiološkim i epidemiološkim prilikama urbanih sredina Republike Hrvatske do danas nisu istražena.

Stoga je cilj ovog diplomskog rada po prvi put u Republici Hrvatskoj, pretraživanjem uzoraka seruma pasa i mačaka na prisustvo IgG protutijela za virus Zapadnog Nila, istražiti postojanje infekcije u ovih vrsta, te mogućnost korištenja domaćih mesojeda kao sentinel životinja za provođenje nadzora nad kretanjem virusa Zapadnog Nila u urbanim sredinama u Republici Hrvatskoj.

2. PREGLED DOSADAŠNJIH SPOZNAJA

2.1. Povijesni podaci i pregled dosadašnjih istraživanja

Virus Zapadnog Nila prvi je put izoliran iz krvi febrilne žene u Ugandi 1937. godine. U početku su se pojavljivali sporadični slučajevi oboljenja ljudi, sve do 1990. godine kada se uočio porast oboljelih u području Mediteranskog mora. U Rumunjskoj je 1996. i 1997. godine zabilježena je epidemija koja je rezultirala s više od 500 kliničkih slučajeva i smrtnošću od oko 10% (TELFORD i EBEL, 2008.). Bolest se 1999. godine po prvi put pojavljuje na području Sjeverne Amerike, i time dobiva dodatni značaj (MUKHOPADHYAY i sur., 2003., BAKONYI i sur., 2006.). Epidemije virusa Zapadnog Nila do kraja 20.-og stoljeća zabilježene su, osim na sjeveroistoku SAD-a, i na jugu Rusije i u Izraelu (TELFORD i EBEL, 2008.). U posljednja se dva desetljeća virus proširio i po svim ostalim kontinentima, izuzev Antarktike. Virus Zapadnog Nila danas se smatra najvažnijim uzročnikom virusnog encefalitisa u ljudi diljem svijeta (BAI i THOMPSON, 2020.).

Na području Republike Hrvatske (RH) prve infekcije ovim uzročnikom potvrđene su dokazom protutijela u stanovnika otoka Brača u razdoblju od 1970. do 1974. godine (VESENJAK-HIRJAN i sur., 1980.). Nakon toga se opisuju sporadični slučajevi infekcija ljudi da bi prva klinička oboljenja bila zabilježena 2012. godine (PEM-NOVOSEL i sur., 2014.). Od tada se smatra da se bolest endemizirala na području naše domovine do današnjeg dana (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2021.). Infekcija životinja na području RH prvi je put opisana u smeđeg medvjeda 1993. godine (MADIĆ i sur., 1993.). Prve infekcije u konja opisuju se u razdoblju od 2001. do 2002. godine na području Istočne Hrvatske (MADIĆ i sur., 2007.), a prvo opsežno istraživanje proširenosti virusa Zapadnog Nila pretraživanjem životinja na području cijele RH provodi se u razdoblju od 2010. do 2011. godine i tada se potvrđuje prisustvo ovog zoonotskog uzročnika u cijeloj državi s najvećom učestalošću infekcija u Istočnoj Hrvatskoj i Istri (BARBIĆ i sur., 2012.). Od tada, temeljem navedenih rezultata, kontinuirano se provodi nadzor proširenosti virusa Zapadnog Nila na području RH čime je dokazana njegova stalna sezonska cirkulacija i endemizacija bolesti u posljednjih desetak godina kao i učinkovitost praćenja preko sentinel životinja u skladu s pristupom „Jedno zdravlje“ (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2021.).

Obzirom da je bolest Zapadnog Nila važna emergentna arbovirusna zoonoza, ključan je nadzor i praćenje kretanja bolesti u svrhu sprječavanja pojave bolesti u ljudi. U ovu svrhu uspješno se provodi nadzor preko konja, divljih ptica i peradi, kao i nadzor pretraživanjem vektora. Međutim problem predstavljaju urbane sredine gdje jedine relevantne domaće životinje mogu biti psi i mačke. Kako se smatralo da psi imaju visoku serokonverziju nakon infekcije virusom Zapadnog Nila, ali uobičajeno ne razviju kliničku sliku, provedeno je istraživanje u Houstonu 2005. godine u kojem se istraživalo mogu li psi biti prikladne sentinel životinje za nadzor ove bolesti. Uzorci krvi prikupljali su se od kraja svibnja do kraja listopada te bili pretraženi imunoenzimnim testom (ELISA) na prisustvo IgM i IgG protutijela. Serokonverzija je utvrđena 6 tjedana prije prvog prijavljenog slučaja u ljudi. Idealne sentinel životinje trebale bi biti osjetljive na infekciju, preživjeti ju, razviti detektibilna protutijela, ne dovoditi u rizik osobe

koje provode istraživanja, te ne razviti viremiju dovoljno snažnu da zaraze vektore komarce. Uzevši sve to u obzir, ovim se istraživanjem dokazalo da bi se upravo psi mogli koristiti kao sentinel životinje za nadzor bolesti Zapadnog Nila (RESNICK i sur., 2007.). Drugo istraživanje provedeno u Šangaju bavilo se istraživanjem seroprevalencije bolesti Zapadnog Nila u pasa i mačaka, te je također ELISA testom potvrđeno prisustvo protutijela u klinički zdravih životinja. Pozitivni rezultati bili su provjereni virus neutralizacijskim testom (VN) zbog moguće križne reakcije s drugim flavivirusima. Zanimljivo je što je ovo istraživanje pokazalo veći broj seropozitivnih mačaka u odnosu na pse, što se objašnjava njihovim karakterističnim načinom života i samim time većom izloženosti ubodima komaraca (LAN i sur., 2011.). Slično istraživanje provedeno je i 2014. godine na Korzici. U tom istraživanju pretraživala se krv ovaca, konja i pasa također u svrhu utvrđivanja prikladnih sentinel životinja. Sve pretraživane ovce bile su negativne na prisustvo IgG protutijela, dok je određeni postotak uzoraka konja i pasa bio pozitivan i ELISA i VN-testom (MAQUART i sur., 2017.).

Uz to, istraživanje provedeno u New Yorku još 1999. godine utvrdilo je seroprevalenciju od 11% u pasa, dok je u istom vremenskom razdoblju i na istoj lokaciji seroprevalencija u ljudi bila značajno niža i iznosila 2,6%. U Louisiani je, 2002. godine, zabilježena seroprevalencija virusa Zapadnog Nila od 26%, a u Houstonu, također 2002. godine, 56,5% u pasa u skloništima (RESNICK i sur., 2007.). Zatim su u jednom višegodišnjem istraživanju dokazana protutijela u pasa u različitim državama Afrike, sa seroprevalencijom u rasponu od 2,2% do 100%, ovisno o lokaciji (DAVOUST i sur., 2014.). Uz to, još su neke od najviših seroprevalencija u pasa zabilježene i u jednoj od Kanadskih provincija, u istraživanju provedenom od 2008. do 2010. godine, gdje je seroprevalencija iznosila 28%, te u Maroku, 2012. godine, gdje je seroprevalencija iznosila čak 62% (GAUNT i sur., 2015., DURAND i sur., 2016.).

2.2. Etiologija i epizootiologija

Virus Zapadnog Nila RNV je virus iz porodice *Flaviviridae*, roda *Flavivirus*. To je ovijeni, relativno mali (~ 50 nm), kuglasti virus, čiji genom čini jednolančana, pozitivna (+) RNV koja kodira tri strukturna proteina: protein kapside (C), glikoprotein ovojnice (E) i prekursorski membranski protein (prM), te sedam nestrukturnih proteina: NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b i NS5 (BARBIĆ i sur., 2013). Pripada serološkoj skupini virusa japanskog encefalitisa, u kojoj se, osim virusa japanskog encefalitisa, nalaze još i virus St. Louis encefalitisa i virus Murray Valley encefalitisa. Virus ima više različitih linija, od kojih su linije 1 i 2 najučestalije. Sojevi linije 1 izdvojeni su u Europi, Sjevernoj Americi, Africi, Aziji i Australiji, a sojevi linije 2 u prošlosti su se većinom izdvajali u supsaharskoj Africi i Madagaskaru (MADIĆ, 2012.). Međutim, 2004. godine u Mađarskoj je izdvojen virus koji je pripadao liniji 2 (MINKE i sur., 2011.), te su se od tada virusi te linije počeli pojavljivati i u drugim državama Europe u kojoj su danas rasprostranjeni sojevi obje linije. Uz njih, opisane su još i linije 3, 4, 5, 6 i 7, koje su izdvojene u raznim dijelovima svijeta, a u budućnosti se očekuje pojava još novih linija (BARBIĆ i sur., 2013). Virus Zapadnog Nila pripada vektorima prenosivim virusima, te se primarno prenosi tijekom hranjenja zaraženih komaraca, najčešće iz roda *Culex*, ali mogu ga prenositi i krpelji. Vrste *Culex*-a ovise o geografskom području. Tako na sjeveru SAD-u i u

Europi dominira *Culex pipiens*, iako se u SAD-u u proljeće može naći još i *Culex restuans*. U Europi je, uz navedene, važan vektor i *Culex quinquefasciatus*, koji još dominira i na jugu SAD-a, Latinskoj Americi i općenito južnoj hemisferi (KRAMER i KAUFFMAN, 2017.). Divlje ptice glavni su rezervoari i domaćini virusa, te se njihovim selidbama virus može prenijeti na velike udaljenosti (DINÇ i YILDIRIM, 2020.). Uzročnik u svom prirodnom ciklusu primarno cirkulira između ptica i komaraca. Kada ptica bude inficirana ubodom zaraženog komarca, virus se umnaža u njoj i nastaje jaka viremija, te se sljedeći, nezaraženi komarac, na njoj zarazi prilikom hranjenja te prenosi uzročnika dalje. Ptice su ključne za stalno cirkuliranje virusa, zbog sposobnosti brzog umnažanja virusa u njima, te preživljavanja infekcije u mnogih vrsta ptica. Širenju bolesti dodatno pogoduje činjenica da je moguć i transovarijalni prijenos virusa sa zaražene ženke komarca na potomstvo, te je na taj način sljedeća generacija komaraca već po leženju zaražena. Virusom su najčešće zaražene divlje ptice, perad, konji, ljudi, ali i psi i mačke. Ljudi se najčešće zaraze ubodom komaraca, iako su zabilježeni i slučajevi prijenosa virusa između ljudi transfuzijom krvi i transplatacijom organa (DENMAN i HART, 2015.), kao i intrauterinom infekcijom i dojenjem (KRAMER i KAUFFMAN, 2017.). Za razliku od ptica, količina virusa u serumu tijekom viremije u ljudi i drugih sisavaca mnogo je manja, te nedostatna za daljnji prijenos komarcima, te se te vrste smatraju krajnjim i slučajnim domaćinima (MADIĆ, 2012.).

2.3. Patogeneza

Virus Zapadnog Nila pokazuje tropizam prema živčanom tkivu. Nakon uboda komarca, infekcija započinje u koži, gdje se virus najprije umnaža u keratinocitima i Langerhansovim stanicama, koje potom migriraju do područnog limfnog čvora u kojem aktiviraju T limfocite. Virus ulazi u krvotok preko limfnog sustava ili direktno tijekom hranjenja komarca. To rezultira primarnom viremijom u kojoj se virus širi do slezene, jetre, bubrega i drugih visceralnih organa, te se tamo nastavlja umnažati i ponovno ulazi u krvotok gdje uzrokuje sekundarnu viremiju. Virus tada prelazi krvno-moždanu barijeru i inficira središnji živčani sustav. Sam mehanizam prodora kroz krvno-moždanu barijeru nije u potpunosti razjašnjen. U mozgu se može umnažati u mnogim stanicama, poput neurona ili astrocita, uzrokujući njihovu apoptozu ili nekrozu, te time dovodi do neurološkog oblika bolesti (BAI i THOMPSON, 2020.). Viremija može trajati nekoliko dana prije pojave kliničkih znakova te naglo prestaje nakon što se pojave klinički znakovi i IgM neutralizacijska protutijela, čija je rana pojava ključna u sprječavanju infekcije središnjeg živčanog sustava (MADIĆ, 2012.).

2.4. Klinička slika

Klinička slika očituje se u ptica, konja i ljudi. Ptice najčešće uopće ne pokazuju znakove bolesti, ali u nekih vrsta može doći i do uginuća. Pokusno zaražene ptice pokazuju znakove potištenosti, imaju nakostriješeno perje, opuštenu glavu i ataksiju, te ugibaju 24 sata od pojave kliničkih znakova bolesti (MADIĆ, 2012.).

Inkubacija bolesti u konja iznosi 3-15 dana. Većina infekcija prolazi asimptomatski. U otprilike samo 10% slučajeva razvit će se klinički simptomi, te su oni u početku nespecifični, poput groznice, depresije, gubitka apetita i kolika. Kada se razviju neurološki simptomi, oni najčešće uključuju encefalitis s ataksijom (BARROS i sur., 2017.). Ataksija je uglavnom izražena na stražnjim udovima, iako mogu biti zahvaćene i prednje noge, te konji radi toga teže ustaju i uglavnom leže (OSTLUND i sur., 2000.). Osim toga mogu se pojaviti i mišićne fascikulacije i opuštenost usnica kao znak deficita kranijalnih živaca, te hiperestezija, škr gutanje zubima, fotofobija i anoreksija. Konji se u slučaju blagih simptoma u pravilu oporave nakon 2-7 dana, dok u konja koji su imali težu kliničku sliku oporavak može trajati između 20 dana i nekoliko mjeseci. Zabilježeno je i da je smrtnost nešto viša u starijih konja (ANGENVOORT i sur., 2013.).

U ljudi inkubacija iznosi 2-6 dana te je infekcija također asimptomatska u 80% slučajeva. U 20% slučajeva izaziva groznicu, koja se očituje nespecifičnim simptomima opće slabosti, bolnošću mišićja, očiju i zglobova, te gastrointestinalnim simptomima poput mučnine, povraćanja i proljeva. Od ovog oblika ljudi se najčešće oporave u potpunosti, ali mogu osjećati umor i slabost još tjednima ili mjesecima nakon preboljenja (BAI i THOMPSON, 2020.). U manje od 1% zaraženih pojavljuje se teški neuroinvazivni oblik koji je podijeljen u 3 klinička sindroma: encefalitis, meningitis i flacidnu paralizu (sindrom poliomijelitisa). Ovaj oblik nerijetko izaziva smrt, osobito u starijih osoba (DUGUMA i sur., 2020.) Mogu se pojaviti simptomi poput visoke temperature, glavobolje koja se pogoršava, ukočenosti vrata, zbunjenosti, tremora, napadaja, stupora, slabosti mišića ili njihove paralize. Ljudi koji prežive ovaj klinički oblik mogu nakon preboljenja osjećati umor, vrtoglavicu, artralgijske, oslabljeno pamćenje, probleme s koncentracijom, depresiju, anksioznost, poremećaje spavanja i glavobolje. Također, pokazalo se da su mnogi pacijenti koji su preboljeli neurološki oblik razvili autoimune bolesti, poput miastenije gravis (BAI i THOMPSON, 2020). Smrtnost je u ljudi viša u slučaju razvijanja encefalitisa u odnosu na meningitis. Na razvijanje neuroinvazivnog oblika bolesti utječu i predisponirajući faktori poput dobi, dijabetesa, hipertenzije i kardiovaskularnih bolesti, a većoj smrtnosti pridonose imunosupresija, kronične bubrežne bolesti i hepatitis C (KRAMER i KAUFFMAN, 2017.).

2.5. Dijagnoza

Poznavanje epidemiološke i epizootiološke situacije te prepoznavanje kliničkih simptoma pomažu prilikom postavljanja sumnje na bolest (SAXENA i sur., 2017). Ipak, obzirom da klinički znakovi nisu specifični, u konja je u slučaju sumnje izrazito važno diferencijalnodijagnostički isključiti bjesnoću te rinopneumonitis konja (BARBIĆ i sur., 2013). Bolest Zapadnog Nila u konja objektivno se dijagnosticira serološkim pretragama, odnosno dokazom specifičnih IgM i IgG protutijela ili dokazom virusne RNK u serumu ili cerebrospinalnoj tekućini. IgM protutijela mogu se dokazati u serumu do 6 tjedana nakon infekcije i znak su akutne bolesti (SAXENA i sur., 2017.), dok IgG protutijela ostaju u serumu i preko 15 mjeseci od infekcije, te su radi toga dijagnostički manje važna, jer su mogla nastati i u infekciji prethodne sezone (MADIĆ, 2012.). Za serološku dijagnostiku najčešće se koriste

komercijalno dostupni imunoenzimni testovi. Ti su testovi osjetljivi, ali problem predstavljaju moguće križne reakcije s protutijelima drugih srodnih flavivirusa. Radi toga pozitivni se rezultati često provjeravaju drugim serološkim metodama, najčešće virus neutralizacijskim testom (SAXENA i sur., 2017.). Bolest se također može dijagnosticirati dokazivanjem virusne RNK RT-PCR-om u serumu, cerebrospinalnoj tekućini i uzorcima tkiva (BAI i THOMPSON, 2020.). Prilikom dijagnosticiranja bolesti u ljudi, u slučaju pojave neuroloških simptoma, osobito akutne flacidne paralize, može pomoći i magnetna rezonancija (KRAMER i KAUFFMAN, 2017.).

2.6. Liječenje i preventiva

Zbog nedostatka etiološkog liječenja, i u ljudi i u životinja provodi se samo potporno i simptomatsko liječenje. Trenutno ne postoji cjepivo za ljude, a obzirom na nisku stopu smrtnosti koju bolest uzrokuje u ljudi, nisu se dosad ni ulagali veliki naponi za usavršavanje cjepiva (KRAMER i KAUFFMAN, 2017.). S druge strane, cjepiva za konje dostupna su već više godina, i u tu svrhu koriste se rekombinanta i inaktivirana cjepiva, a u područjima gdje se cijepjenje provodi, životinje se cijepi prije sezone komaraca (MADIĆ, 2012.). Problem predstavlja nemogućnost razlučivanja protutijela nastalih cijepljenjem od onih nastalih prirodnom infekcijom, što otežava nadzor bolesti. Ipak, glavna metoda sprječavanja infekcije izbjegavanje je izloženosti komarcima, što na osobnoj razini podrazumijeva korištenje repelenata, nošenje duge odjeće te ugradnja komarnika na prozore i vrata. Profilaksa se u konja provodi dezinskcijama u okolini objekata u kojima konji borave te uništavanjem staništa komaraca, a također pomaže i držanje životinja u zatvorenim prostorima u vrijeme svitanja i sumraka, što je vrijeme najveće aktivnosti komaraca. U slučaju pojave bolesti u ljudi provode se protuepidemijske mjere koje uključuju larvicidni i adulticidni postupak dezinskcije u okolini mjesta infekcije (BARBIĆ i sur., 2013).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Pretraživani uzorci

U istraživanju je pretraženo ukupno 184 uzoraka seruma pasa i 92 uzoraka seruma mačaka. Koristili su se ostatni uzorci seruma, koji su bili uzeti kroz 2020.-tu godinu u svrhu pretraživanja na SARS-CoV-2, te su nakon tog istraživanja arhivirani u Virološkom laboratoriju Veterinarskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

Uzorci su bili prikupljeni na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu na Klinici za kirurgiju, ortopediju i oftalmologiju, Klinici za porodništvo i reprodukciju, Klinici za unutarnje bolesti i Klinici za zarazne bolesti. Za ovo istraživanje odabrani su uzorci prikupljeni u razdoblju od kolovoza do prosinca 2020. godine. To je razdoblje određeno zbog procjene da bi serumi uzeti tada, uzevši u obzir sezonost vektora komaraca i vrijeme potrebno za serokonverziju u životinja, trebali imati najveću vjerojatnost pozitivnog rezultata. Glavnina uzoraka potjecala je od životinja koje borave na području Grada Zagreba (169 uzoraka seruma pasa i 88 uzoraka seruma mačaka), a manji dio uzoraka od životinja s područja Zagrebačke županije (15 uzoraka seruma pasa i 4 uzorka seruma mačaka). Pri odabiru seruma za istraživanje životinje su bile odabirane i s obzirom na pasminu i dob. Pretraživani su psi srednje velikih i velikih pasmina, stariji od godinu dana. Oni su bili ciljna skupina zbog pretpostavke da veći psi više vremena provode u prirodi i time imaju veću mogućnost zaražavanja, a psi mlađi od godine dana isključeni su iz istraživanja zbog uobičajenoga pretežitog boravka u stambenim objektima kao i isključivanja mogućnosti pozitivnih nalaza uslijed kolostralnog imuniteta. Što se tiče mačaka, najveći broj seruma bio je uzet od pasmine domaće mačke, obzirom da je to najučestalija pasmina u domaćinstvima. Uz njih, posebno su bile izabrane sve mačke koje su pripadale čistokrvnim pasminama, poput maine coon, ruske modre mačke ili orijentalne mačke. To su pasmine koje su uobičajeno skuplje i time dodatno pažene, te je pretpostavka da ne provode toliko vremena vani kao domaće mačke i dokaz njihove zaraženost imalo bi još veći značaj jer bi ukazivala na mogućnost zaražavanja u stambenim objektima. Sve su odabrane mačke također bile starije od godinu dana iz ranije navedenih razloga za pse. Osim navedenog, za svaku su životinju bili zabilježeni podaci o razlogu dolaska na kliniku i spolu kako bi istražili eventualne moguće kliničke manifestacije i spolnu dispoziciju.

3.2. Serološka dijagnostika

U istraživanju se za dokaz protutijela specifičnih za virus Zapadnog Nila koristio komercijalni komplet za izvođenje imunoenzimnog testa (ELISA) INgezim West Nile Compac (Immunologia y Genetica Aplicada, S.A., Madrid, Španjolska). Test radi na principu blokirajućeg imunoenzimnog testa. Jažice mikrotitracijskih plitica obložene su antigenom u procesu proizvodnje. Ispitujući serum dodaje se u plitice i ako serum sadrži specifična protutijela, ona će se vezati za antigen, dok ako ih serum ne sadrži, neće se vezati i antigen ostaje slobodan. Nakon toga u plitice se dodaje konjugat, koji sadrži specifična monoklonska

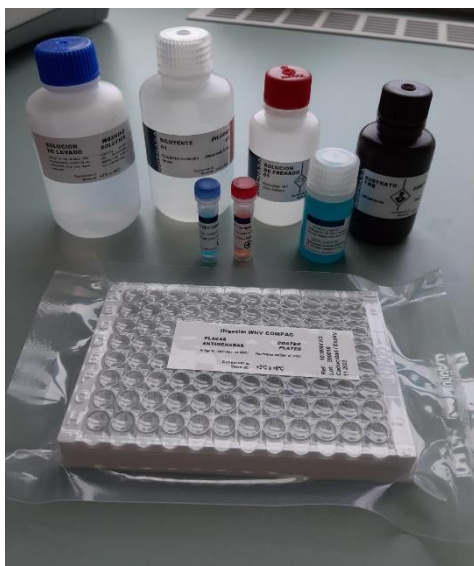
protutijela konjugirana enzimom peroksidazom. Ako uzorak seruma sadrži specifična protutijela, ona neće dopustiti vezanje monoklonskih protutijela za antigen, dok ako ih uzorak seruma ne sadrži, monoklonska će se protutijela vezati za antigen. Nakon ispiranja, kojim se uklanjaju sve nevezane komponente, u plitice se dodaje supstrat. Njime se otkriva prisutnost ili odsutnost monoklonskih protutijela, jer on u prisutnosti peroksidaze razvija kolorimetrijsku reakciju.

Navedeni dijagnostički komplet sadrži (Slika 1.) :

1. Mikrotitracijsku pliticu s 96 jažica, u koje je tijekom proizvodnje vezan antigen
2. Pozitivni kontrolni serum
3. Negativni kontrolni serum
4. Konjugat peroksidaze
5. Koncentriranu otopinu za ispiranje
6. Otopinu za razrjeđivanje seruma
7. Stop otopinu
8. Supstrat (TMB)

Za provođenje testa korišteni su i sljedeći pribor i oprema:

1. Jednokanalna automatska mikropipeta zapremnine 10-100 μ l (Eppendorf)
2. Višekanalna automatska mikropipeta zapremnine 10-100 μ l (Eppendorf)
3. Automatski ispirać mikrotitracijskih plitica (Hydroflex, Tecan, Männedorf, Švicarska)
4. Tresilica FVL-2400N Combi-Spin (bioSan, Riga, Latvija)
5. Čitač mikrotitracijskih plitica (Sunrise, Tecan, Männedorf, Švicarska)
6. Staklena menzura zapremnine 1000 ml
7. Nastavci za pipete
8. Destilirana voda
9. Lateks rukavice



Slika 1. Sadržaj komercijalnog kompleta za izvođenje imunoenzimnog testa (ELISA) INgezim West Nile Compac

3.3 Priprema seruma i otopine za razrjeđivanje

Prije početka izvođenja testa potrebna je priprema uzoraka i reagensa. Svi reagensi iz kompleta temperiraju se na sobnu temperaturu (20°C - 25°C), a svi serumi homogeniziraju na tresilici prije njihova korištenja. Uzorci seruma testiraju se razrijeđeni u omjeru 1:5, na način da se u svaku jažicu mikrotitracijske plitice jednokanalnom automatskom mikropipetom dodaje 10 µl seruma i višekanalnom automatskom mikropipetom 40 µl otopine za razrjeđivanje seruma, koja je dio komercijalnog kompleta. Koncentrirana otopina za ispiranje dobivena u kompletu razrjeđuje se 25 puta s destiliranom vodom na način da se u staklenu menzuru dodaje 40 ml otopine za ispiranje, te 960 ml destilirane vode kako bi dobili radnu otopinu za ispiranje.

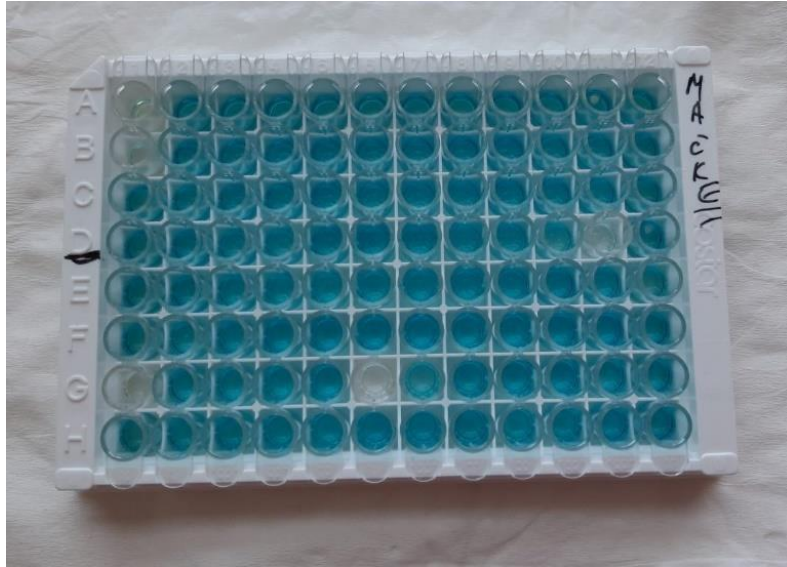
3.4. Izvođenje pretrage

Test počinje dodavanjem uzoraka seruma i otopine za razrjeđivanje seruma, kako je prethodno opisano, u 92 jažice. Važno je za svaki uzorak seruma koristiti novi nastavak za pipetu. U preostale jažice dodaje se u po dvije jažice pozitivni kontrolni serum, te druge dvije negativni kontrolni serum. Kontrolni se serumi ne razrjeđuju pa ih se u svaku jažicu dodaje po 50 µl. Plitica se zatim nježno zaljulja, kako bi se sadržaj jažica dobro pomiješao, prekrije se plastičnom folijom i ostavi inkubirati pri sobnoj temperaturi (20°C - 25°C) preko noći (16 – 24 sati). Nakon završetka vremena inkubacije, jažice se ispiru tri puta u automatskom ispiraču mikrotitracijskih plitica s 300 µl prethodno pripremljene radne otopine za ispiranje (Slika 2.). Po završetku ispiranja, plitica se naglo preokrene na filter papir kako bi se uklonila zaostala otopina.

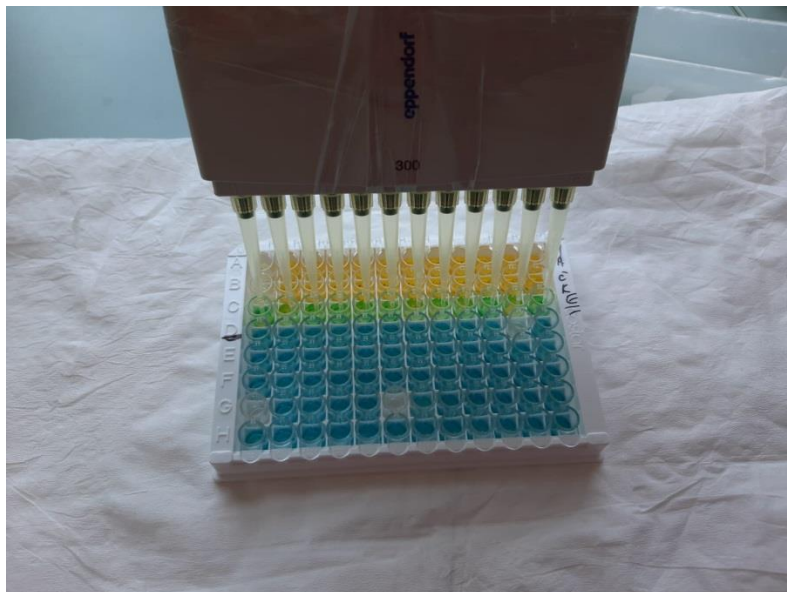


Slika 2. Ispiranje jažica mikrotitracijske plitice u automatskom ispiraču mikrotitracijskih plitica

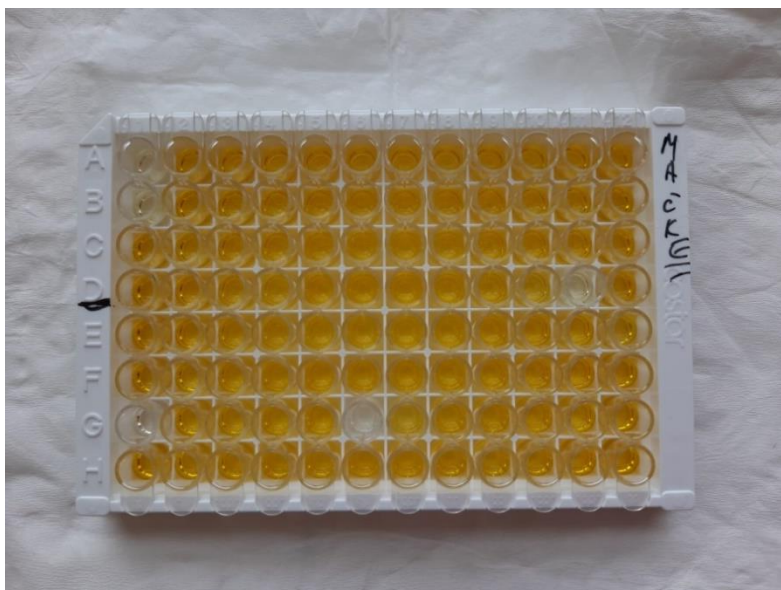
U sljedećem se koraku u svaku jažicu višekanalnom automatskom mikropipetom dodaje 50 μ l konjugata. Plitica se ponovno prekrije folijom i ostavi inkubirati pri sobnoj temperaturi sat vremena. Nakon toga ponovno se ispiru pet puta u automatskom ispiraču s 300 μ l radne otopine za ispiranje, te se zatim dodaje 50 μ l supstrata u svaku jažicu. Supstrat je osjetljiv na svjetlo, pa se plitica, nakon njegovog dodatka, inkubira još 15 minuta na zamračenom mjestu (Slika 3.). Zatim se u svaku jažicu dodaje 50 μ l stop otopine, koja je jako nagrizajuće sredstvo, te se koristi s oprezom uz upotrebu rukavica (Slika 4., Slika 5.). Rezultati se očitavaju 5 minuta nakon dodavanja stop otopine, pomoću čitača mikrotitracijskih plitica pri valnoj duljini od 450 nm.



Slika 3. Mikrotitracijska plitica nakon dodavanja supstrata i inkubacije



Slika 4. Mikrotitracijska plitica tijekom dodavanja stop otopine



Slika 5. Mikrotitracijska pločica nakon dodavanja stop otopine

3.5. Validacija testa

Radi provjere ispravnosti komercijalnog kompleta i pouzdanosti rezultata obavezno je testiranje pozitivnih i negativnih kontrolnih seruma. U uputama proizvođača propisano je da se test smatra ispravnim i rezultati pouzdanim ako je optička gustoća (OD) u jažicama s negativnom kontrolom viša od 0.8, a optička gustoća u jažicama s pozitivnom kontrolom manja od 0.35.

3.6. Izračunavanje i interpretacija rezultata

Zadnji korak u izvođenju testa očitavanje je rezultata pri valnoj duljini od 450 nm u čitaču mikrotitracijskih pločica. Čitač određuje optičku gustoću u svakoj jažici mikrotitracijske pločice, odnosno za svaki pojedini pretraženi serum. Za interpretaciju rezultata potrebno je izračunati postotak inhibicije svakog seruma prema sljedećoj formuli:

$$\text{postotak inhibicije uzorka} = 100 - [(\text{OD uzorka} / \text{OD negativne kontrole}) \times 100]$$

Uzorci se smatraju pozitivnima, dakle sadrže IgG protutijela specifična za virus Zapadnog Nila, ako je postotak inhibicije veći ili jednak 40 %, dok se uzorci smatraju negativnima, ako je postotak inhibicije manji ili jednak 30%.

Uzorci s postotkom inhibicije između 30% i 40% smatraju se sumnjivima, te se trebaju dodatno testirati VN-testom.

3.7. Statistička obrada rezultata

Prikupljeni podaci i postignuti rezultati prikazani su deskriptivnom statistikom, a obrađeni korištenjem deskriptivnih statističkih metoda te je načinjena i statistička analiza rezultata korištenjem Fisher egzaktnog testa s obzirom na rezultate. Granica statističke značajnosti označena je na $p < 0,05$.

4. REZULTATI

U provedenom istraživanju pretraženo je 184 uzoraka seruma pasa i 92 uzoraka seruma mačaka. Po završetku pretraživanja provedenog komercijalnim imunoenzimnim testom INgezim West Nile Compac dokazana su specifična IgG protutijela za virus Zapadnog Nila u ukupno 11 uzoraka seruma pasa (detaljni podaci o životinjama prikazani su na kraju poglavlja Rezultati u Tablici 14.), dok su 4 pretraživana uzorka seruma pasa rezultirala sumnjivim rezultatom (detaljni podaci o životinjama prikazani su na kraju poglavlja Rezultati u Tablici 15.). Pretraživanjem 92 uzorka seruma mačaka u 4 uzorka seruma dokazana su protutijela za virus Zapadnog Nila (detaljni podaci o životinjama prikazani su na kraju poglavlja Rezultati u Tablici 16.), dok su 2 uzorka imala sumnjiv rezultat (detaljni podaci o životinjama prikazani su na kraju poglavlja Rezultati u Tablici 17.).

Kako bi mogli usporediti postignute rezultate istraživanja, a s obzirom da u ovom istraživanju nisu provedene dodatne laboratorijske metode kojima bi mogli sumnjive rezultate razlučiti kao pozitivne ili negativne, sve sumnjive rezultate smatrali smo negativnim.

Shodno tome, seroprevalencija za virus Zapadnog Nila ustanovljena u pasa bila je 5,98%, a za mačke 4,34% (Tablica 1.).

Statističkom obradom rezultata nije ustanovljena značajna razlika u seroprevalenciji infekcija virusom Zapadnog Nila u pasa i mačaka.

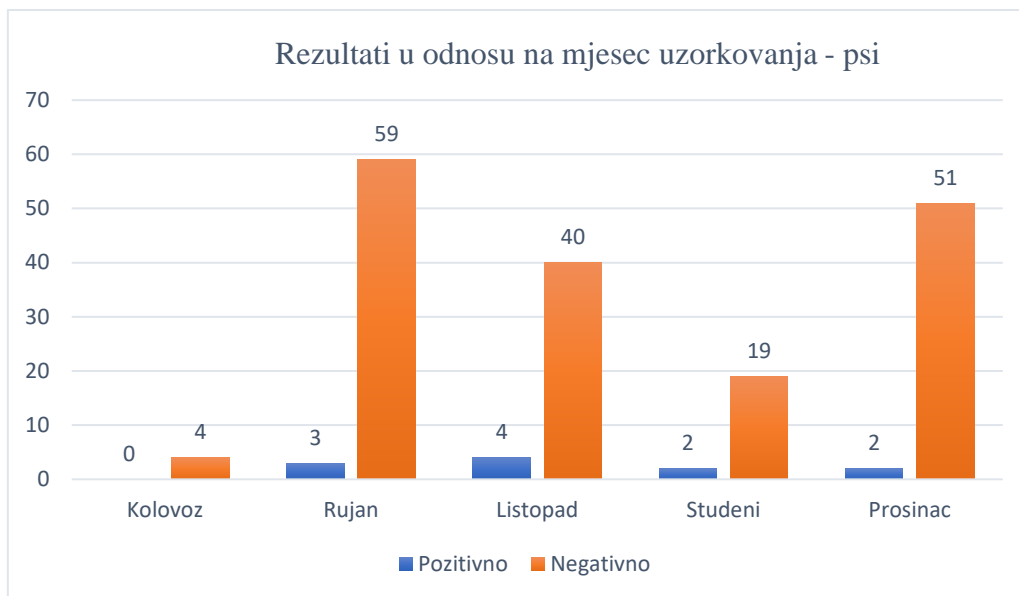
Tablica 1. Seroprevalencija po životinjskim vrstama

| | Broj uzoraka | Pozitivni | Sumnjivi | Negativni | Seroprevalencija |
|--------------|---------------------|------------------|-----------------|------------------|-------------------------|
| Psi | 184 | 11 | 4 | 169 | 5,98% |
| Mačke | 92 | 4 | 2 | 86 | 4,35% |

Uzorci seruma pasa uzorkovani su od kolovoza do prosinca 2020. godine. Prvi pozitivni rezultati potvrđeni su u uzorcima uzorkovanim u rujnu 2020. godine. Analizirajući broj i postotak pozitivnih rezultata po mjesecima najveći broj pozitivnih uzoraka ustanovljen je u uzorcima uzorkovanim u studenom (9,5%) i listopadu (9,1%), dok je u rujnu (4,8%) te prosincu (3,8%) ona bila dvostruko i više manja. Ovo opažanje statističkom obradom rezultata nije potvrđeno kao značajno (Tablica 2., Grafikon 1.).

Tablica 2. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na mjesec uzimanja uzoraka

| Mjesec uzorkovanja | Kolovoz | Rujan | Listopad | Studeni | Prosinac |
|---------------------------|----------------|--------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Pozitivno | 0 | 3 | 4 | 2 | 2 |
| Negativno | 4 | 59 | 40 | 19 | 51 |



Grafikon 1. Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u pasa prema mjesecima uzorkovanja

Prema dobi pretraživanih pasa najveći broj pozitivnih životinja ustanovljen je u dobnoj skupini od četiri do sedam godina (9,3%), zatim u dobnoj skupini od osam do jedanaest godina (8,2%) te u skupini životinja starijih od 12 godina (3,0%). Za razliku od navedenih dobni skupina, u pretraženih 35 životinja mlađih od 3 godine nije bilo dokaza infekcije virusom Zapadnog Nila. Statističkom obradom nije dokazana značajnost navedenih razlika (Tablica 3., Grafikon 2.).

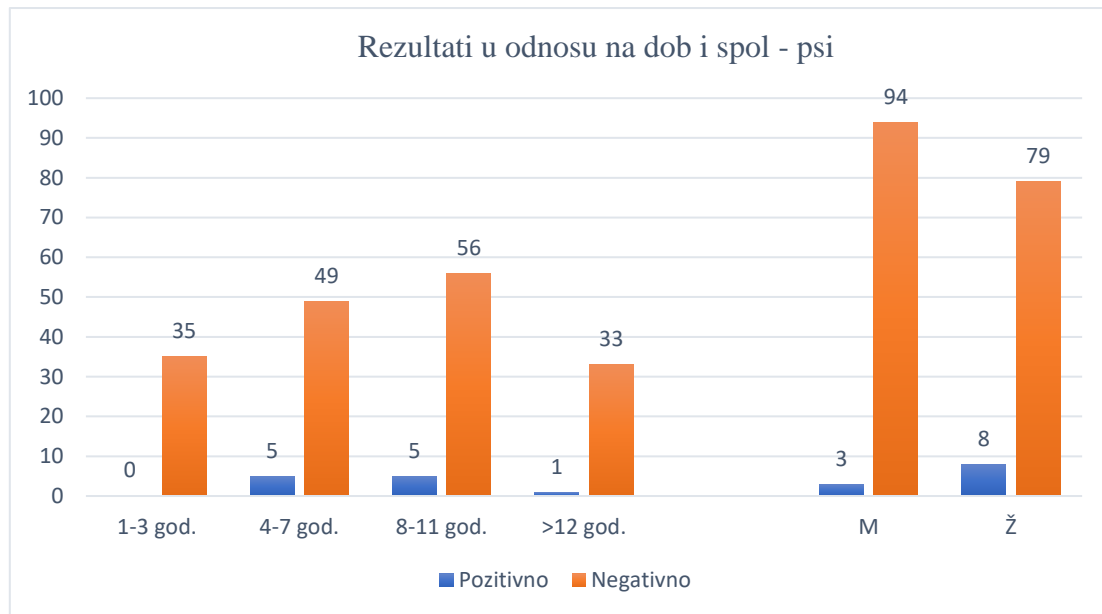
Tablica 3. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na dob

| Dob | 1-3 | 4-7 | 8-11 | >12 |
|------------------|-----|-----|------|-----|
| Pozitivno | 0 | 5 | 5 | 1 |
| Negativno | 35 | 49 | 56 | 33 |

Analizirajući spol pretraženih pasa ukupno je istraživanjem obuhvaćeno 97 mušjaka (52,7%) i 87 ženki (47,3%). U skupini mušjaka ustanovljena je seroprevalencija od 3,1% dok je u ženki ona iznosila 9,2%. Iako je seroprevalencija trostruko veća u ženki u odnosu na mušjake statistički nije dokazana značajnost ove uočene razlike (Tablica 4., Grafikon 2.).

Tablica 4. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na spol

| Spol | M | Ž |
|------------------|----|----|
| Pozitivno | 3 | 8 |
| Negativno | 94 | 79 |



Grafikon 2. Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u pasa prema dobi i spolu pretraživanih životinja

Uzorci seruma pasa bili su od životinja s područja Grada Zagreba (91,8%) te manji broj s područja Zagrebačke županije (8,2%). Seroprevalencija u pasa s područja Grada Zagreba iznosila je 4,7%, a s područja Zagrebačke županije čak 20%. Iako je uočljiv nesrazmjera u broju uzoraka obuhvaćenih istraživanjem, ustanovljena četverostruka razlika u seroprevalenciji na županijskoj razini je i statistički značajna ($p=0.0488$) (Tablica 5., Grafikon 3.).

Tablica 5. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na županiju u kojoj borave

| Županija | Grad Zagreb | Zagrebačka |
|------------------|-------------|------------|
| Pozitivno | 8 | 3 |
| Negativno | 161 | 12 |

Kako bi istražili poveznicu kliničkog očitovanja i seropozitiviteta pretraživane životinje su prema razlogu dolaska na klinike Sveučilišne veterinarske bolnice podijeljene u skupinu s neurološkim kliničkim znakovima (13,0%) te ostalim stanjima (87%). U skupini s neurološkim znakovima seroprevalencija je iznosila 8,3% dok je u ostalih životinja bila 5,6%, te nije ustanovljena statistička značajnost razlika seroprevalencije prema razlogu dolaska i kliničkim znakovima (Tablica 6., Grafikon 3.).

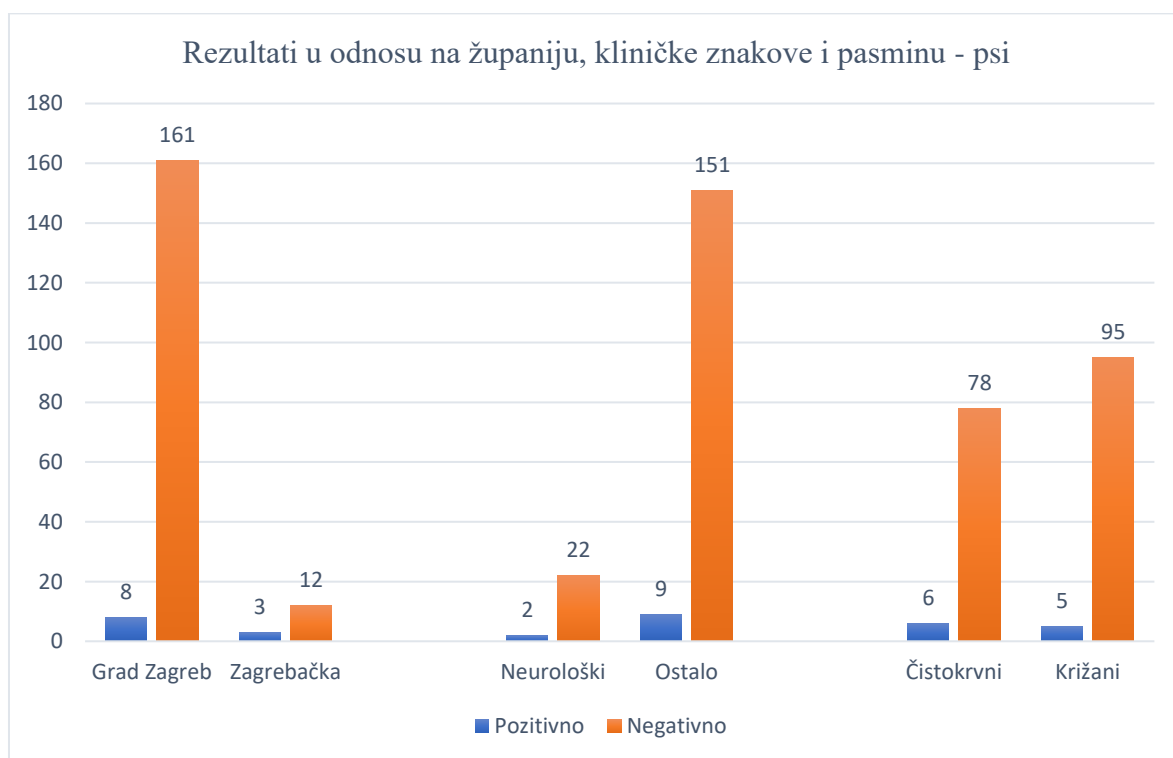
Tablica 6. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na kliničke znakove

| Klinički znakovi | Neurološki | Ostalo |
|------------------|------------|--------|
| Pozitivno | 2 | 9 |
| Negativno | 22 | 151 |

Rezultati istraživanja analizirani su i u skupini čistokrvnih pasa u odnosu na križane pse. U čistokrvnih pasa kojih je pretraženo 84 (45,7%) seroprevalencija je iznosila 7,1% dok je u 100 pretraženih križanih pasa (54,3%) seroprevalencija iznosila 5,0%. Nije ustanovljen statistički značaj seroprevalencije u čistokrvnih u odnosu na križane pse (Tablica 7., Grafikon 3.).

Tablica 7. Rezultati pretraživanja pasa u odnosu na pasminu

| Pasmina | Čistokrvni | Križani |
|-----------|------------|---------|
| Pozitivno | 6 | 5 |
| Negativno | 78 | 95 |

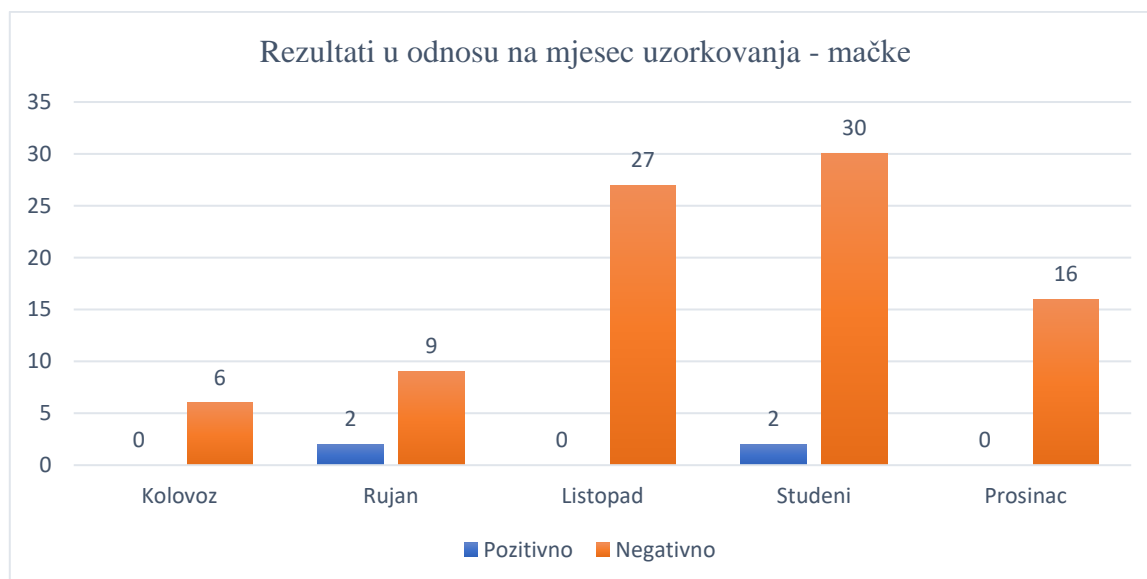


Grafikon 3. Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u pasa prema županiji broravka, kliničkim znakovima zbog kojih su primljeni na Sveučilišnu veterinarsku bolnicu i pasmini pretraživanih životinja

Pretraživanjem uzoraka seruma mački dokazana je seroprevalencija od 4,34%. Analizirajući postignute rezultate prema mjesecu uzorkovanja pozitivne životinje su potvrđene u rujnu (18,1%) te studenom (6,25%). Svi uzorci uzorkovani u kolovozu, listopadu i prosincu bili su negativni. Razlike seroprevalencije mačaka ovisno o mjesecu uzorkovanja nisu statistički značajne (Tablica 8., Grafikon 4.).

Tablica 8. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na mjesec uzimanja uzoraka

| Mjesec uzorkovanja | Kolovoz | Rujan | Listopad | Studeni | Prosinac |
|--------------------|---------|-------|----------|---------|----------|
| Pozitivno | 0 | 2 | 0 | 2 | 0 |
| Negativno | 6 | 9 | 27 | 30 | 16 |



Grafikon 4. Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u mačaka prema mjesecima uzorkovanja

Prema dobi pretraživanih mačaka najveći broj pozitivnih životinja ustanovljen je u dobnoj skupini od osam do jedanaest godina (7,7%). Gotovo identična seroprevalencija ustanovljena je u životinja u dobi iznad jedanaest godina (7,4%), dok je u mačaka u dobi od četiri do sedam godina iznosila 4,3%. Svih 29 mačaka u dobi od jedne do tri godine bile su negativne. Statističkom obradom nije dokazana značajnost navedenih razlika (Tablica 9., Grafikon 5.).

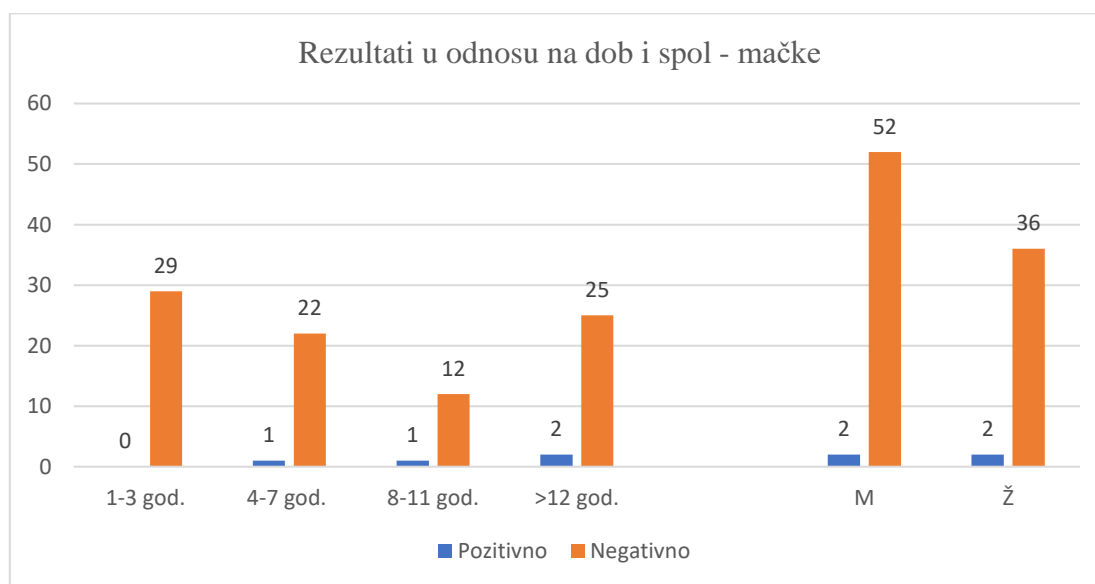
Tablica 9. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na dob

| Dob | 1-3 | 4-7 | 8-11 | >12 |
|------------------|-----|-----|------|-----|
| Pozitivno | 0 | 1 | 1 | 2 |
| Negativno | 29 | 22 | 12 | 25 |

Prema spolu mačaka u istraživanju je ukupno pretraženo 54 mušjaka (58,7%) i 38 ženki (41,3%). U skupini mušjaka ustanovljena je seroprevalencija od 3,7% dok je u ženki ona iznosila 5,3%. Razlike u seroprevalenciji prema spolu pretraživanih životinja nisu bile statistički značajne (Tablica 10., Grafikon 5.).

Tablica 10. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na spol

| Spol | M | Ž |
|------------------|----|----|
| Pozitivno | 2 | 2 |
| Negativno | 52 | 36 |

**Grafikon 5.** Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u mačaka prema dobi i spolu pretraživanih životinja

Uzorci seruma mačaka bili su od životinja s područja Grada Zagreba (95,7%) te četiri uzorka s područja Zagrebačke županije (4,3%). Seroprevalencija u mačaka s područja Grada Zagreba iznosila je 4,5%, dok su uzorci životinja s područja Zagrebačke županije bili negativni. (Tablica 11., Grafikon 6.). Nije ustanovljena statistička značajnost u seroprevalenciji između ovih skupina životinja.

Tablica 11. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na županiju u kojoj borave

| Županija | Grad Zagreb | Zagrebačka |
|------------------|--------------------|-------------------|
| Pozitivno | 4 | 0 |
| Negativno | 84 | 4 |

Kako bi istražili poveznicu kliničkog očitovanja i seropozitiviteta pretraživane životinje su prema razlogu dolaska na klinike Sveučilišne veterinarske bolnice podijeljene u skupinu s neurološkim kliničkim znakovima (4,3%) te ostalim stanjima (95,7%). Životinje s neurološkim znakovima bile su negativne dok je u skupini životinja s ostalim dijagnozama seroprevalencija iznosila 4,5%. Nije ustanovljena statistička značajnost u seroprevalenciji između ovih skupina životinja (Tablica 12., Grafikon 6.).

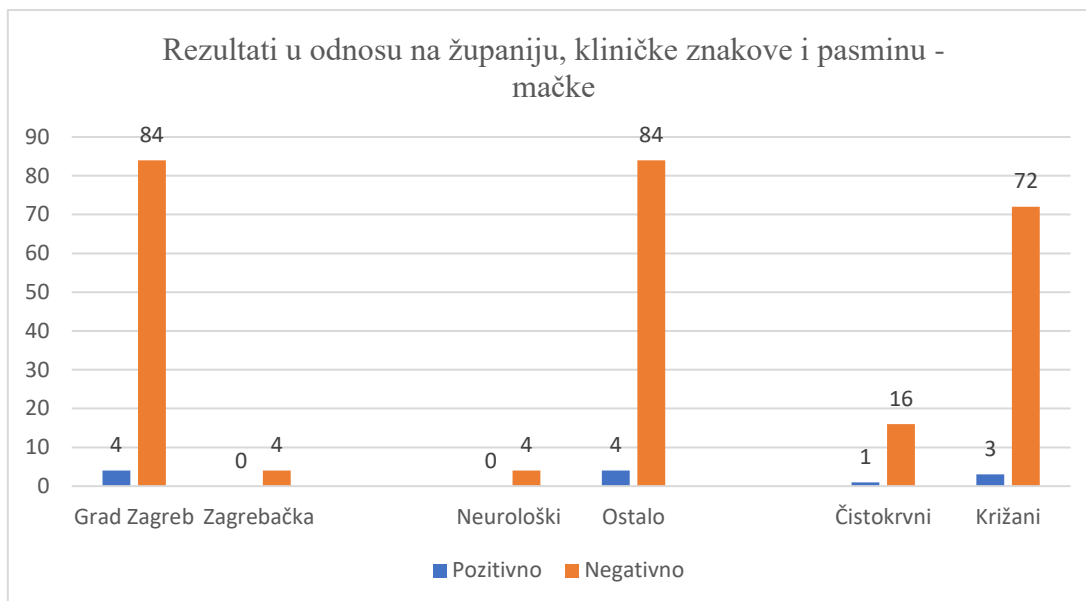
Tablica 12. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na kliničke znakove

| Klinički znakovi | Neurološki | Ostalo |
|-------------------------|-------------------|---------------|
| Pozitivno | 0 | 4 |
| Negativno | 4 | 84 |

Rezultati istraživanja analizirani su i u skupini čistokrvnih mačaka u odnosu na križane mačke. U čistokrvnih mačaka kojih je pretraženo 17 (18,5%) potvrđena je jedna pozitivna životinja (5,9%) pasmine maine coon, dok su od 75 pretraženih križanih mačaka (81,5%) pozitivne bile tri (4,0%). Nije ustanovljen statistički značaj seroprevalencije u čistokrvnih u odnosu na križane mačke (Tablica 13., Grafikon 6.).

Tablica 13. Rezultati pretraživanja mačaka u odnosu na pasminu

| Pasmina | Čistokrvni | Križani |
|------------------|-------------------|----------------|
| Pozitivno | 1 | 3 |
| Negativno | 16 | 72 |



Grafikon 6. Rezultati istraživanja seroprevalencije infekcija virusom Zapadnog Nila u mačaka prema županiji boravka, kliničkim znakovima zbog kojih su primljeni na Sveučilišnu veterinarsku bolnicu i pasmini pretraživanih životinja

Tablica 14. Podaci o serološki pozitivnim psima na virus Zapadnog Nila

| Oznaka uzorka | Datum uzimanja uzorka | Pasmina | Dob | Spol | Lokacija | Razlog dolaska na kliniku | Ingezim test * |
|---------------|-----------------------|--------------------|--------|------|----------------|---|----------------|
| 2363 | 03.09.2020. | njemački ovčar | 8 god | Ž | Zagreb | Sistematski pregled | 94,59% |
| 1610* | 19.09.2020. | labrador retriever | 9 god | M | Zagreb | Dermatološki | 43,71% |
| 2591 | 23.09.2020. | argentinski pas | 7 god | Ž | Zaprešić | Jela travu i povraćala pjenu, gravidna je | 52,93% |
| 2103 | 07.10.2020. | križanac | 10 god | Ž | Zagreb | Gastroduodenopatija, koprostaza | 96,09% |
| 2035 | 14.10.2020. | tornjak | 10 god | Ž | Zagreb | Sukrvica iz usta (tvorba u području kutnjaka) | 90,02% |
| 2038 | 14.10.2020. | križanac | 16 god | Ž | Zagreb | Sumnja na unutarnje krvarenje | 93,39% |
| 1635 | 20.10.2020. | križanac | 7 god | M | Jastrebarsko | Neurološki pregled | 46,12% |
| 1739 | 02.11.2020. | belgijski ovčar | 10 god | Ž | Zagreb | Ne jede, ne pije, nema stolicu, samo leži, apatična | 46,85% |
| 1767 | 05.11.2020. | križanac | 6 god | M | Zagreb | Kontrola epilepsije | 95,41% |
| 2176 | 08.12.2020. | njemački ovčar | 4 god | Ž | Odranski obrež | Ugrizna rana u području stražnje lijeve noge | 41,34% |
| 2721 | 29.12.2020. | križanac | 4 god | Ž | Zagreb | Povraćanje, proljev | 95,75% |

* *postotak inhibicije uzorka: $100 - [(OD \text{ uzorka} / OD \text{ negativne kontrole}) \times 100]$*

Tablica 15. Podaci o psima sa serološki sumnjivim rezultatima pretraživanja na virus Zapadnog Nila

| Oznaka uzorka | Datum uzimanja uzorka | Pasma | Dob | Spol | Lokacija | Razlog dolaska na kliniku | Ingezim test* |
|---------------|-----------------------|-----------------|--------|------|----------|---------------------------|---------------|
| 2561 | 26.09.2020. | njemački bokser | 7 god | M | Zagreb | Češe se po vratu | 30,87% |
| 2000 | 09.10.2020. | križanac | 5 god | M | Zagreb | Oftalmološki pregled | 30,08% |
| 2178 | 08.12.2020. | križanac | 4 god | M | Zagreb | Opstipacija | 36,53% |
| 2690 | 23.12.2020. | križanac | 18 god | Ž | Zagreb | Povraćanje, eutanazija | 37,29% |

* *postotak inhibicije uzorka: $100 - [(OD \text{ uzorka} / OD \text{ negativne kontrole}) \times 100]$*

Tablica 16. Podaci o serološki pozitivnim mačkama na virus Zapadnog Nila

| Oznaka uzorka | Datum uzimanja uzorka | Pasma | Dob | Spol | Lokacija | Razlog dolaska na kliniku | Ingezim test* |
|---------------|-----------------------|------------|--------|------|----------|---------------------------------------|---------------|
| 2450 | 11.09.2020. | domaća | 4 god | M | Zagreb | Trauma, udarac automobila | 86,89% |
| 2570 | 28.09.2020. | domaća | 13 god | Ž | Zagreb | Krvavi urin | 44,59% |
| 1492 | 09.11.2020. | maine coon | 9 god | M | Zagreb | Tekućina u prsnoj i trbušnoj šupljini | 93,38% |
| 1350 | 14.11.2020. | domaća | 14 god | Ž | Zagreb | Povraćanje | 94,42% |

* postotak inhibicije uzorka: $100 - [(OD \text{ uzorka} / OD \text{ negativne kontrole}) \times 100]$

Tablica 17. Podaci o mačkama sa serološki sumnjivim rezultatima pretraživanja na virus Zapadnog Nila

| Oznaka uzorka | Datum uzimanja uzorka | Pasma | Dob | Spol | Lokacija | Razlog dolaska na kliniku | Ingezim test* |
|---------------|-----------------------|-----------------------|--------|------|----------|------------------------------------|---------------|
| 2264 | 22.08.2020. | britanska kratkodlaka | 7 god | M | Zagreb | Povraćanje, jaki gingivostomatitis | 30,94% |
| 226 | 26.10.2020. | križana | 16 god | M | Zagreb | Više mijauče, manje jede | 39,44% |

* postotak inhibicije uzorka: $100 - [(OD \text{ uzorka} / OD \text{ negativne kontrole}) \times 100]$

5. RASPRAVA

Bolest Zapadnog Nila, kao emergentna zoonoza, predstavlja javnozdravstveni problem obzirom na mogućnost oboljenja i smrti u ljudi koja se, na žalost, bilježe kontinuirano i na području RH posljednjih godina. Stoga se sustavno provodi sustav nadzora cirkuliranje virusa na različite načine. S obzirom na prirodni ciklus virusa pokušavalo se pratiti pojavu virusa i virusnu aktivnost utvrđivanjem infekcije u uginulih divljih ptica i komaraca, no to se pokazalo nedostatnim obzirom da takav pristup ovisi o prijavljivanju uginuća ptica od strane stanovništva, što nije pouzdano. Uz to, na taj se način može utvrditi prisutnost virusa, ali kako ptice u kratko vrijeme mogu prijeći velike udaljenosti, samo mjesto uginuća ne mora biti isto, niti blizu, mjesta infekcije i obitavanja zaraženih komaraca. Samim time, ovakav je oblik praćenja virusa nedostatan, jer onemogućuje precizno lociranje mjesta na kojima borave inficirani komarci što onemogućava protuepidemijsko djelovanje na vektore i sprječavanje infekcija (RESNICK i sur., 2007.). Iz tog se razloga razvila potreba za korištenjem sentinel životinja, koje bi kao takve dale uvid u pojavnost virusa u prostornom i vremenskom okviru te omogućile provođenje protuepidemijskih mjera na vrijeme u svrhu sprječavanje zaražavanja životinja i ljudi. Konji se u tu svrhu koriste već godinama, ali obzirom na njihov mali broj i neadekvatnu rasprostranjenost u urbanim sredinama, pojavila se potreba za pronalaskom druge vrste koja će vjernije prikazati cirkuliranje virusa u neposrednoj blizini ljudi, posebice urbanim sredinama (BARBIĆ i sur., 2012). Također, obzirom da konji mogu razviti kliničku sliku prilikom zaražavanja, samim time ne predstavljaju idealne sentinel životinje, a cijepljenje konja, koje se u nekim državama provodi, onemogućuje razlikovanje protutijela nastalih infekcijom od onih nastalih cijepljenjem što može kompromitirati rezultate nadzora. Istraživanje provedeno na vojnim konjima i psima u Maroku 2012. godine pokazalo je da je seroprevalencija u tih vrsta, koje su boravile u istom okruženju, bila gotovo ista, te ukazalo na mogućnost korištenja pasa za praćenje i nadzor virusa, pogotovo u područjima gdje su konji cijepljeni (DURAND i sur., 2016.). Drugo istraživanje, provedeno na Siciliji 2010. godine, testiranjem seruma pasa dokazalo je cirkuliranje virusa u tom području daleko prije nego što je prijavljen prvi klinički slučaj u ljudi, te se tim istraživanjem potvrdila mogućnost i značaj korištenja kućnih ljubimaca kao sentinel životinja u urbanim sredinama (PURPARI i sur., 2012.).

Kućni ljubimci po mnogočemu odgovaraju idealnim sentinel životinjama za praćenje bolesti Zapadnog Nila. Psi i mačke ne razvijaju kliničku sliku prilikom infekcije, te nisu u izravnoj opasnosti od nje, ali stvaraju detektibilna protutijela koja omogućuju otkrivanje virusne aktivnosti na prostoru njihova boravka. Izloženi su istim uvjetima okoliša kao i njihovi vlasnici, te se znaju točne granice njihova kretanja, što bi olakšalo određivanje točnog staništa zaraženih komaraca. Osim toga, veliki broj pasa i mačaka kućnih ljubimaca u urbanim sredinama omogućuje veliki broj dostupnih uzoraka, koji se mogu prikupljati prilikom uobičajenih kliničkih pregleda u veterinarskim ambulancama bez narušavanja dobrobiti životinja u svrhu nadzora infekcije virusom Zapadnog Nila (AUSTGEN i sur., 2004., DURAND i sur., 2016., LÓPEZ-ALONSO, M., 2018.).

Utvrđivanje serokonverzije u pasa i mačaka provedeno je u nekim državama svijeta, ali u Republici Hrvatskoj do sad nije provođeno.

U ovom istraživanju dokazali smo seroprevalenciju u pasa od 5,98% te u mačaka od 4,35%. Ovi rezultati predstavljaju prvu potvrdu infekcije virusom Zapadnog Nila u pasa i mačaka na području Republike Hrvatske. Ustanovljena seroprevalencija niža je od nekih istraživanja (GAUNT i sur, 2015., DURAND i sur., 2016.), odnosno slična vrijednostima seroprevalencije dobivenim u drugim brojnim istraživanjima (LAN i sur., 2011., PURPARI i sur., 2012., MAQUART i sur., 2017., DINÇ i YILDIRIM, 2020.). Objašnjenje za nižu seroprevalenciju možemo tražiti u različitim vrijednostima seroprevalencije i u ljudi u pojedinim državama jer učestalost infekcija i u ljudi značajno varira ovisno o specifičnoj epidemiološkoj i epizootiološkoj situaciji nekog područja. Seroprevalencija u ljudi na području RH iste 2020. godine iznosila je 3,2% (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2021.) tako da je ona bila približno jednaka ustanovljenoj ovim istraživanjem u pasa i mačaka. Ova podudarnost ide u prilog mogućnosti korištenja pasa i mačaka kao sentinel životinja u epidemiološkim i epizootiološkim prilikama RH. Program nadzora virusa Zapadnog Nila na području RH 2020. godine provodila se pretraživanjem konja. Provedbom Programa ustanovljena je seroprevalencija u konja od 18,6% (VILIBIĆ-ČAVLEK i sur., 2021.). Ovakva značajno viša seroprevalencija u konja je moguće posljedica pretraživanja na području cijele države, a posebice uključenosti životinja iz istočnih županija u kojima je kontinuirano značajno viša seroprevalencija nego u ostatku RH. Također viša seroprevalencija u konja može biti i rezultat veće izloženosti i imunoreaktivnosti ove vrste što ih upravo i čini izvrsnim sentinel životinjama u smislu rane potvrde virusne aktivnosti na nekom području. Međutim, za urbana područja gdje nema konja, ili su malobrojni na jednoj lokaciji, rezultati ovog istraživanja su dokazali mogućnost i potrebu za uvođenjem pasa i mačaka kao sentinel životinja.

Analizirajući prikupljene podatke o pretraživanim životinjama jedino statistički značajno viša seroprevalencija ustanovljena je u pasa iz Zagrebačke županije u odnosu na pse s područja Grada Zagreba. Ovaj rezultat treba sagledavati kritički jer je pretražen mali broj uzoraka te je broj uzoraka iz ove dvije županije bio nerazmjern. Razlike po županijama potrebno je u svakom slučaju dodatno istražiti te rezultate usporediti sa seroprevalencijom u konja i ljudi prije donošenja konačnih zaključaka.

Sve ostale razlike u seroprevalenciji ovisno o analiziranim pokazateljima (dob, spol, pasmina, klinički znakovi, mjesec uzorkovanja) nisu bile statistički značajne niti u pasa niti u mačaka. Upravo izostanak značajnih razlika u seroprevalenciji u različitim vrstama i skupinama unutar vrste, još jednom potvrđuje da su psi i mačke izvrsne sentinel životinje za nadzor bolesti Zapadnog Nila jer se mogu pretraživati životinje iz opće populacije bez posebnih ograničenja i poteškoća u interpretaciji rezultata.

Negativni rezultati pretraženih uzoraka obje vrste životinja uzorkovanih u kolovozu te pozitivni od rujna podudaraju se s uobičajenom sezonom infekcija u ljudi. Stoga možemo pretpostaviti da je osjetljivost istraživanih vrsta na infekcije virusom Zapadnog Nila približna onoj u ljudi, a manja u odnosu na konje što je također potrebno dodatno istražiti. S druge strane izostanak povezanosti seroprevalencije i očitovanja neuroloških znakova ukazuje na asimptomatske infekcije pasa i mačaka.

Izostanak pozitivnih nalaza u životinja u dobnoj skupini od jedne do tri godine zahtjeva daljnje istraživanje kako bi razjasnili moguće uzroke koji mogu biti posljedica različitih načina držanja i korištenja ovisno o dobi životinja.

Sveukupni rezultati istraživanja predstavljaju prvi dokaz infekcija virusom Zapadnog Nila pasa i mačaka na području Republike Hrvatske. Analiza seroprevalencije različitih skupina ukazuje da se u programu nadzora mogu koristiti i psi i mačke s očekivanom jednakom osjetljivošću i značajem postignutih rezultata. Rezultati potvrđuju da je potrebno nadzor provoditi od rujna u životinja starijih od 3 godine te da možemo očekivati rezultate dokaza učestalosti infekcija koji su u jasnoj korelaciji s učestalošću infekcija u ljudi u istoj sezoni.

S obzirom na dokazanu učinkovitost provedbe programa nadzora ove potencijalno letalne zoonoze pretraživanjem konja, ptica i peradi, dosadašnji program je potrebno i nastaviti provoditi uz nadogradnju pretraživanjem kućnih ljubimaca u urbanim sredinama kako bi u potpunosti kroz veterinarsku djelatnost prikupili vjerodostojne i neprocijenjive podatke za javno zdravstvo te u skladu s pristupom „Jedno zdravlje“ zajednički čuvali zdravlje životinja i ljudi.

6. ZAKLJUČCI

1. Infekcija virusom Zapadnog Nila u pasa i mačaka dokazana je po prvi put na području Republike Hrvatske utvrđivanjem IgG protutijela u serumu pretraživanih životinja.
2. Ukupna seroprevalencija u istraživanih pasa iznosila je 5,98%, a ukupna seroprevalencija u istraživanih mačaka iznosila je 4,34%.
3. Nije ustanovljena statistički značajna razlika u seroprevalenciji u pasa i mačaka.
4. Pozitivne životinje obje istraživane vrste su bile u dobi od četiri godine ili više, a prvi pozitivni nalazi dokazani su u uzorcima uzorkovanim tijekom rujna.
5. Spol, pasmina i klinički znakovi nisu imali utjecaja na seroprevalenciju u različitim istraživanim skupinama.
6. Ustanovljena sezonost i seroprevalencija u obje istraživane vrste je slična onoj ustanovljenoj u ljudi u istoj godini.
7. Sveukupni rezultati potvrđuju da psi i mačke mogu biti sentinel životinje za virus Zapadnog Nila u epidemiološkim i epizootiološkim prilikama ove zoonoze na području RH te da njihovim pretraživanjem možemo dobiti objektivne podatke za urbane sredine koji provedbom trenutnog programa nisu dostatni.

7. LITERATURA

- ANGENVOORT, J., A. C. BRAULT, R. A. BOWEN, M. H. GROSCHUP (2013): West Nile viral infection of equids. *Vet. Microbiol.* 167, 168-180. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.08.0138.
- AUSTGEN, L. E., R. A. BOWEN, M. L. BUNNING, B. S. DAVIS, C. J. MITCHELL, G.-J. J. CHANG (2004): Experimental Infection of Cats and Dogs with West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 10, 82-86.
- BAI, F., E. A. THOMPSON (2021): West Nile Virus (*Flaviviridae*). U: *Encyclopedia of Virology*. 4th ed. (Bamford, D. H., M. Zuckerman, ured.), Academic Press, Cambridge, Massachusetts, 884-890. doi:10.1016/B978-0-12-809633-8.21504-5.
- BAKONYI, T., É. IVANICS, K. ERDÉLYI, K. URSU, E. FERENCZI, H. WEISSENBÖCK, N. NOWOTNY (2006): Lineage 1 and 2 Strains of Encephalitic West Nile Virus, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 618-623.
- BARBIĆ, LJ., E. LISTEŠ, S. KATIĆ, V. STEVANOVIĆ, J. MADIĆ, V. STAREŠINA, A. LABROVIĆ, A. DI GENNARO, G. SAVINI (2012): Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Vet. Microbiol.* 159, 504-508. doi: 10.1016/j.vetmic.2012.04.038.
- BARBIĆ, LJ., V. STEVANOVIĆ, Z. MILAS, V. STAREŠINA, N. TURK, Z. ŠTRITOF MAJETIĆ, J. HABUŠ, M. PERHARIĆ, S. KOVAČ, K. MARTINKOVIĆ, V. MOJČEC PERKO, J. MADIĆ (2013): Virus Zapadnog Nila u Hrvatskoj – veterinarski aspekt. *Hrvatski veterinarski vjesnik*. 21, 7-8., 46-54.
- BARROS, S. C., F. RAMOS, T. FAGULHA, M. DUARTE, A. M. HENRIQUES, H. WAAP, T. LUÍS, T. COSTA, R. AMADOR, S. QUINTANS, M. FEVEREIRO (2017): West Nile virus in horses during the summer and autumn season of 2015 and 2016, Portugal. *Vet. Microbiol.* 212, 75-79. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.008.
- DAVOUST, B., I. LEPARC-GOFFART, J.-P. DEMONCHEAUX, R. TINE, M. DIARRA, G. TROMBINI, O. MEDIANNIKOV, J.-L. MARIÉ (2014): Serological Surveillance for West Nile Virus in Dogs, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1415-1417. doi: 10.3201/eid2008.130691.
- DENMAN, S., A. M. HART (2015): Arthropod-borne Disease: West Nile Fever. *J. Nurse Pract.* 11, 27-33.
- DINÇ, E., Y. YILDIRIM (2020): Serological Investigation of West Nile Virus (WNV) Infection in Cats and Dogs. *Annu. Res. Rev. Biol.* 35, 65-71. doi:10.9734/ARRB/2020/v35i130181.
- DUGUMA, D., L. M. RUEDA, M. DEBBOUN (2020): Mosquito-Borne Diseases. U: *Mosquitoes, Communities, and Public Health in Texas* (Debboun, M., M. Reyna Nava, L. M. Rueda, ured.), Academic Press, London, UK; San Diego, CA, 319-337. doi: 10.1016/B978-0-12-814545-6.00011-0.

- DURAND, B., H. HASKOURI, S. LOWENSKI, N. VACHIERY, C. BECK, S. LECOLLINET (2016): Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Marocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiol. Infect.* 144, 1-8. doi:10.1017/S095026881600011X.
- GAUNT, M. C., C. WALDNER, S. M. TAYLOR (2015): Serological Survey of West Nile Virus in Pet Dogs from Saskatchewan, Canada. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 15, 755-758. doi: 10.1089/vbz.2015.1780.
- KRAMER, L. D., E. KAUFFMAN (2017): West Nile Virus (Flaviviridae). Reference Module in Biomedical Sciences. 1-15. doi: 10.1016/B978-0-12-801238-3.02696-9.
- LAN, D., W. JI, D. YU, J. CHU, C. WANG, Z. YANG, X. HUA (2011): Serological evidence of West Nile virus in dogs and cats in China. *Arch. Virol.* 156, 893-895. doi: 10.1007/s00705-010-0913-8.
- LÓPEZ-ALONSO, M. (2018): Pets as Sentinels of Human Exposure. U: *Encyclopedia of Environmental Health*. 2nd ed. (Nriagu, J. O., ured.), Elsevier, Amsterdam, 133-141. doi: 10.1016/B978-0-12-409548-9.11704-X.
- MADIĆ, J. (2012): Infekcija virusom Zapadnog Nila. U: *Veterinarski priručnik*. 6. izdanje. (Herak-Perković, V., Ž. Grabarević, J. Kos, ured.), Medicinska naklada, Zagreb, 2565-2568.
- MADIĆ, J. D. HUBER, B. LUGOVIĆ (1993): Serological survey for selected viral and rickettsial agents of brown bears (*Ursus arctos*) in Croatia. *J. Wildl. Dis.* 29, 572-576. doi: 10.7589/0090-3558-29.4.572
- MADIĆ, J. G. SAVINI, A. DI GENNARO, F. MONACO, B. JUKIĆ, S. KOVAČ, N. RUDAN, E. LISTEŠ (2007): Serological evidence for West Nile virus infection in horses in Croatia. *Vet. Rec.* 160, 772- 773. doi: 10.1136/vr.160.22.772
- MAQUART, M., M. DAHMANI, J.-L. MARIÉ, P. GRAVIER, I. LEPARC-GOFFART, B. DAVOUST (2017): First Serological Evidence of West Nile Virus in Horses and Dogs from Corsica Island, France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 17, 1-3. doi: 10.1089/vbz.2016.2024.
- MINKE, J. M., L. SIGER, L. CUPILLARD, B. POWERS, T. BAKONYI, S. BOYUM, N. NOWOTNY, R. BOWEN (2011): Protection provided by a recombinant ALVAC®- WNV vaccine expressing the prM/E genes of a lineage 1 strain of WNV against a virulent challenge with a lineage 2 strain. *Vaccine.* 29, 4608-4612. doi:10.1016/j.vaccine.2011.04.058.
- MUKHOPADHYAY S., B.-S. KIM, P. R. CHIPMAN, M. G. ROSSMANN, R. J. KUHN (2003): Structure of West Nile virus. *Science.* 302, 248.
- OSTLUND, E.N., J.E. ANDRESEN, M. ANDRESEN (2000): West Nile encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 427-441.
- PEM-NOVOSEL, I., T. VILIBIĆ-ČAVLEK, I. GJENERO-MARGAN, N. PANDAK, LJ. PERIĆ, LJ. BARBIĆ, E. LISTEŠ, A. CVITKOVIĆ, V. STEVANOVIĆ, G. SAVINI (2014): First Outbreak of West Nile Virus Neuroinvasive Disease in Humans, Croatia, 2012. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 14, 82-84.

PURPARI, G., G. SAVINI, F. MONACO, P. CALISTRI, A. DI GENNARO, V. CANNELLA, F. VITALE, F. MIRA, C. DI BELLA, A. GUERCIO, R. LELLI (2012): Importance of dogs as sentinels of West Nile Virus activity in urban and suburban areas. *Int. J. Infect. Dis.* 16, 270. doi: 10.1016/j.ijid.2012.05.923.

RESNICK, M. P., P. GRUNENWALD, D. BLACKMAR, C. HAILEY, R. BUENO, K.O. MURRAY (2007) : Juvenile Dogs as Potential Sentinels for West Nile Virus Surveillance. *Zoonoses Public Hlth.* 55, 443-447. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01116.x.

SAXENA, V., B. G. BOLLING, T. WANG (2017): West Nile Virus. *Clin. Lab. Med.* 37, 243-252. doi: 10.1016/j.cll.2017.01.001.

TELFORD III, S. R., G. D. EBEL (2008): West Nile Disease. Academic Press, 571-579.

VESENJAK-HIRJAN, J. M. GALINOVIĆ-WEISGLASS, Z. BRUDNJAK, C. H. CALISHER, D. TOVORNIK, J. S. LAZUICK, Z. RENDIĆ (1980): Island of Brač - Focus of Arbovirus Infections. U: *Arboviruses in the Mediterranean Countries* (Vesenjajk-Hirjan, J., J. S. Porterfield, E. Arslanagić, ured.), Gustav Fischer Verlag, Stuttgart – New York, 311-317.

VILIBIĆ-ČAVLEK, T., V. SAVIĆ, A. KLOBUČAR, T. FERENC, M. ILIĆ, M. BOGDANIĆ, I. TABAIN, V. STEVANOVIĆ, M. SANTINI, M. CURMAN POSAVEC, S. PETRINIĆ, I. BENVIN, I. FERENČAK, V. ROŽAC, LJ. BARBIĆ (2021): Emerging Trends in the West Nile Virus Epidemiology in Croatia in the 'One Health' Context, 2011-2020. *Trop. Med. Infect. Dis.* 6, 140. doi: 10.3390/tropicalmed6030140.

8. SAŽETAK

Psi i mačke kao sentinel životinje za bolest Zapadnog Nila u urbanim sredinama

Bolest Zapadnog Nila emergentna je zoonoza koju uzrokuje RNA virus iz porodice *Flaviviridae*, roda *Flavivirus*. Virus prirodno cirkulira između rezervoara ptica i vektora komaraca, najčešće roda *Culex*. Osim u ptica i peradi, infekcija je dokazana i u mnogih sisavaca. Uz ptice, u kojih većina vrsta uopće ne pokazuju simptome dok je za neke visoka smrtnost, klinički najčešće oboljevaju konji i ljudi. Ljudi se inficiraju gotovo isključivo tijekom hranjenja inficiranih komaraca što je i primarni način infekcije životinja. Stoga, sa svrhom dokaza virusne cirkulacije na određenom području, u svrhu usmjeravanja protuepidemijskih mjera, provode se programi pretraživanja sentinel životinja kako bi dokazom infekcije životinja potvrdili prisustvo inficiranih komaraca na nekom području. Za ovu svrhu najčešće se pretražuju konji te perad. Ograničenje ovog dokazano učinkovitog sustava je nemogućnost njegova provođenja u urbanim sredinama. Stoga je cilj ovog istraživanja bio dokazati prisutnost infekcije virusom Zapadnog Nila u pasa i mačaka, te time istražiti mogućnost njihovog korištenja kao sentinel životinja za ovu bolest u urbanim sredinama. U tu svrhu ukupno je pretraženo 184 uzorka seruma pasa i 92 uzoraka seruma mačaka, u kojima su se pretraživanjem komercijalnim ELISA testom (INgezim West Nile Compac) utvrđivala IgG protutijela za virus Zapadnog Nila. Sve pretražene životinje bile su s područja županija Grad Zagreb i Zagrebačka. Seroprevalencija ustanovljena u pasa iznosila je 5,98%, a u mačka 4,34%. Nije dokazana značajna razlika između seroprevalencije u istraživanih vrsta kao niti utjecaj pasmine, spola niti poveznica s kliničkim znakovima. Prvi dokazi infekcije u obje vrste potvrđeni su u rujnu, a sve životinje mlađe od četiri godine bile su negativne.

Sveukupni rezultati istraživanja potvrđuju po prvi put na području RH infekcije pasa i mačaka virusom Zapadnog Nila. Analizom postignutih rezultata potvrđeno je da psi i mačke mogu biti sentinel životinje u urbanim područjima pretraživanjem kojih se mogu prikupiti relevantni podaci za nadzor i suzbijanje ove zoonoze. Stoga je dosadašnje programe nadzora potrebno nadopuniti pretraživanjem ovih vrsta kako bi nastavili uspješan nadzor ove opasne arbovirusne zoonoze koja se endemizirana na području RH, a sve u skladu s inicijativom „Jedno zdravlje“.

Ključne riječi: virus Zapadnog Nila, psi, mačke, ELISA, sentinel životinje, seroprevalencija

9. SUMMARY

Dogs and cats as sentinels for West Nile virus in urban areas

West Nile fever is an emergent zoonosis caused by an RNA virus of the family Flaviviridae of the genus Flavivirus. Virus naturally circulates between birds, which are reservoir hosts and mosquitoes, primary genus *Culex*, which are vectors. Except in birds and poultry, infection is also confirmed in many mammals. Along with the birds, in which majority of species don't show clinical symptoms at all, while for some mortality rate is high, clinical manifestation is most common in horses and people. People are almost exclusively infected during the feeding of infected mosquitoes, which is also the primary route of transmission of infection in animals. So, to show the evidence of virus circulation in a particular area, for the purpose of anti-epidemic measures, sentinels surveillance programs are being implemented in order to confirm the presence of infected mosquitoes by detecting infected sentinel animals in certain areas. Horses and poultry are most often used domestic animal species for this purpose. This generally effective system has limitation in its implementation in urban areas. Therefore, the aim of this study was to investigate West Nile virus infection in dogs and cats and by achieving that, also to investigate the possibility of using them as sentinels in urban areas. For this purpose, a total of 184 dog and 92 cat sera samples were tested using a commercial ELISA test (INgezim West Nile Compac) for the determination of IgG antibodies for the West Nile virus. All tested animals were from the Grad Zagreb and Zagrebačka county area. Seroprevalence established in dogs was 5,98%, while in cats 4,34%. There was no significant difference between seroprevalences in these species nor the influence of the breed, sex, or clinical symptoms on seroprevalence. The first evidence of infection in both species was confirmed in September, and all animals younger than 4 years were negative. Results of this study confirm the West Nile virus infection in dogs and cats for the first time in Croatia. With the analysis of the achieved results, it is confirmed that dogs and cats can be sentinels in urban areas. By using dogs and cats as sentinels a relevant data for surveillance and control of this zoonosis can be collected. Hence, ongoing West Nile virus surveillance programs should be upgraded with testing dogs and cats in urban area to improve surveillance of this important arboviral zoonosis in accordance with the „One Health“ approach.

Keywords: West Nile virus, dogs, cats, ELISA, sentinels, seroprevalence

10. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 07.12.1996. godine u Zagrebu. Pohađala sam Osnovnu školu Luka u Sesvetama, nakon čijeg sam se završetka 2011. godine upisala u Gimnaziju Sesvete. Tokom osnovne škole pohađala sam i završila Glazbenu školu Zlatka Grgoševića u kojoj sam učila svirati violinu, te bila član Plesnog studija Step by step u kojem sam se bavila stepom i jazzom, te pohađala mnoga europska i svjetska natjecanja. Tokom srednje škole dodatno sam učila engleski u Školi stranih jezika Vodnikova. 2015. godine upisala sam Veterinarski fakultet u Zagrebu. Kratko sam volontirala na Klinici za porodništvo i reprodukciju. Sve sam ispite na studiju položila s prosjekom 4,58.

Uz engleski jezik, koji izvrsno govorim i pišem, posjedujem i A2 diplomu iz francuskog jezika, a talijanski učim samostalno.